

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 411—414, September 1971

Über eine neue einfache radiochemische Bestimmung von Arginase

Eigenschaften und Verhalten von Arginase im Serum bei Normalpersonen und Leberkranken¹⁾

Von J. ADLUNG, K. LORENTZ und H. GRAZIKOWSKA

Aus der Röntgen- und Radioisotopenabteilung (Leiter: Prof. Dr. H. Uthgenannt) der I. Medizinischen Klinik
(Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Akademie Lübeck

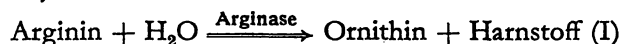
(Eingegangen am 24. Mai 1971)

Die Aktivität von Arginase im Serum kann durch direkte Messung des aus Arginin-[¹⁴C] gebildeten Harnstoff-[¹⁴C] bestimmt werden. Das Verfahren erfordert die Trennung von Substrat und Reaktionsprodukt durch zweimalige Fällung von Arginin mit Phosphorwolframsäure, ist wenig arbeitsaufwendig und sehr empfindlich. Mit 100 mM Arginin und 1 mM Mn²⁺ fanden wir bei pH 8,5 für Normalpersonen Enzymaktivitäten von $6,5 \pm 3,2$ U/l ($\bar{x} \pm s$) (37°). Bei schweren Fällen von Hepatitis und dystrophischen Prozessen bei Lebercirrhose ist die Aktivität im Serum erhöht.

A simple radiochemical determination of arginase

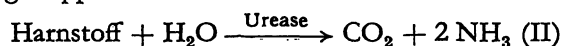
The activity of arginase can be very simply determined in serum by the measurement of the ¹⁴C-urea formed from ¹⁴C-arginine. The substrate and reaction product are separated by twice precipitating the arginine with phosphotungstic acid; there are few manipulations and the method is very simple. With 0.1M arginine, Mn²⁺ as activator and at pH 8.5, the arginase activity for normal persons was 6.5 ± 3.2 U/l (37°). In severe cases of hepatitis and dystrophic conditions in liver cirrhosis, the arginase activity in the serum is increased.

Arginase (L-Arginin-Amidohydrolase, EC 3.5.3.1) katalysiert die Reaktion



wobei das Reaktionsgleichgewicht weit auf der rechten Seite liegt. Die Enzymaktivität wird daher nur in dieser Richtung nach folgenden Prinzipien bestimmt:

1. Abnahme der Argininkonzentration (chemisch mittels SAKAGUCHI-Reaktion (1—5) oder durch UV-Differenzspektrophotometrie (6)).
2. Messung der Ornithinbildung (enzymatisch mit Ornithin-Aminotransferase (7) oder chemisch mit Ninhydrin (8—10)).
3. Zunahme der Harnstoffkonzentration, wobei entweder Harnstoff selbst durch Reaktion mit Xanthidrol (11—13), Diacetylderivaten (14—20) oder Dimethylaminobenzaldehyd (21, 22) gemessen wird, oder die in der gekoppelten Reaktion



entstehenden Produkte Ammoniak (23—26), CO₂ (27 bis 29) oder ¹⁴CO₂ aus Guanidino-[¹⁴C]-Arginin (30) bestimmt werden. Die Messung von ¹⁴CO₂ ist auch durch Oxydation von Harnstoff mittels salpetriger Säure möglich (31).

Während die beiden ersten Verfahren infolge der hohen Michaelis-Konstante des Enzyms für Arginin, starker UV-Absorption durch Proteine, hoher Aminosäurekonzentrationen (die das entstehende Ornithin maskieren) oder durch die Notwendigkeit, das Hilfsenzym anzureichern, keine Bestimmung der Arginase im Serum zulassen, stört beim dritten der Harnstoffgehalt

des Serums die direkten Bestimmungen empfindlich, sofern er nicht durch Gelfiltration (14, 18) zuvor entfernt wird.

Im Gegensatz zu diesen aufwendigen oder mit hohen Leerwerten verbundenen Verfahren ist die radiochemische Messung von Harnstoff-[¹⁴C] einfach, spezifisch und bedarf keiner besonderen Isolierungsschritte. Wir möchten im folgenden über ein sehr einfaches Verfahren berichten, das für Routineuntersuchungen mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler geeignet ist. Prinzip ist die direkte Messung von Harnstoff-[¹⁴C] nach Fällung des Arginin-[¹⁴C] durch Phosphorwolframsäure.

Material und Methodik

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, aus analysereinen Substanzen der Fa. Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) mit demin. Wasser angesetzt. Guanidino-[¹⁴C]-Arginin (spez. Aktivität 20—40 mC/mMol.) und Harnstoff-[¹⁴C] (spez. Aktivität 20—20 mC/mMol.) bezogen wir von Amersham (England). Neben Seren von Gesunden und Leberkranken benutzten wir angereicherte Humansen mit Zusatz von Arginase aus Rinderleber (Schuchardt, München).

Reagenzien

1. Arginin 0,22M in 0,10M Triäthanolamin, auf pH 8,5 eingestellt.
2. Lösung 1 mit 50 nC Guanidino-[¹⁴C]-Arginin pro ml.
3. MnCl₂, 0,05M, gelöst in 0,01N HCl.
4. Phosphorwolframsäure 12proz. in 4proz. Trichloressigsäure gelöst.
5. Phosphorwolframsäure 20,7proz. in 4proz. Trichloressigsäure gelöst.
6. BRAY'sche Lösung (32).

Vorgehen

0,5 ml Serum werden mit 0,1 ml Manganchloridlösung und 0,5 ml Arginin-[¹⁴C]-Lösung bei 37° über 3 Std. (Wasserbad) inkubiert. Unterbrechen der Reaktion durch Zugabe von 3,0 ml

¹⁾ Mit Unterstützung der Volkswagenstiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

12proz. Phosphorwolframsäure. Für jeden Analysenwert wird ein Leerwert (Zugabe von Substrat zum Serum unmittelbar vor Fällung mit Phosphorwolframsäure) mitgeführt. Der weißliche Niederschlag wird mit einem Glasstab gut verrührt und anschließend bei 3000 g 10 Min. zentrifugiert. Das im Überstand verbliebene Arginin- ^{14}C wird durch eine 2. Fällung eliminiert. Hierzu werden nacheinander 0,2 ml Argininlösung 1 (ohne Arginin- ^{14}C) und 0,7 ml 20,7proz. Phosphorwolframsäure zugegeben und wie oben weiter verarbeitet. Vom Überstand werden jeweils 3,0 ml mit 12,0 ml BRAY'scher Lösung gemischt und im Flüssigkeitsszintillationszählgerät (Fa. Packard 3380) gemessen.

Berechnung

Da Zerfälle/Min. gemessen werden, muß auf die spez. Aktivität des eingesetzten Arginins- ^{14}C (A-dpm/110 μMol .) bezogen werden. A-dpm wird für jede Meßreihe nur einmal durch Verdünnen von 0,5 ml Arginin- ^{14}C (Lösung 2) auf 5,0 ml mit Wasser und Messung von 3,0 ml Gemisch ermittelt. Die Arginaseaktivität berechnet sich dann aus der Differenz der Zerfälle/Min. aus Analyse und Leerwert (Δdpm), dividiert durch die spezifische Aktivität und multipliziert mit den Faktoren für das Serumaliquot (= 2000) und die Inkubationszeit (= 1/180) nach

$$\mu\text{Mol Harnstoff} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{Min.}^{-1} = \text{dpm} \cdot \frac{2000 \cdot 110}{180 \cdot \text{A-dpm}}$$

$$\text{U/l} = 1220 \cdot \frac{\Delta\text{dpm}}{\text{A-dpm}}$$

Ergebnisse

Fällung, Wiederfindung, Empfindlichkeit

Neben einer vollständigen Enteiweißung ist die komplette Entfernung von Arginin aus dem Reaktionsansatz unumgänglich. Da ein zu hoher Überschuß an Phosphorwolframsäure die Messung in Bray'scher Lösung unmöglich macht, ermittelten wir deren optimale Menge (mg pro Ansatz) durch Zusatz steigender Phosphorwolframsäure-Konzentrationen zum Gemisch aus Serum und Arginin. Die Wiederfindung von Harnstoff wurde mit verschiedenen Seren überprüft. Hierzu wurde die ^{14}C -Aktivität in der Argininlösung- ^{14}C durch Harnstoff- ^{14}C ersetzt. Die Wiederfindung lag immer über 95%.

Abbildung 1 und 2 zeigen die Abhängigkeit der Harnstoffbildung von der Konzentration an Mangan und Arginin. Die Aktivierung der Arginase im Serum beginnt erst oberhalb 1 mM Mn^{++} , das Substratoptimum für Arginin liegt bei 0,1M. Höhere Konzentrationen hemmen gering.

Eigenschaften menschlicher Serum-Arginase

Mit der beschriebenen Methode ist Arginase im menschlichen Serum immer nachweisbar. Die Harnstoffbildung aus Arginin folgt über mindestens 6 Stunden einer Funktion nullter Ordnung (Abb. 3). Eine Enzymaktivität von 2,5 U/l kann noch sicher nachgewiesen werden (Analysenwert größer als Leerwert + 2 Standardabweichungen, $n = 30$).

Die Abhängigkeit vom pH-Wert wurde mit verschiedenen Puffern (Phosphat 0,2M, Triäthanolamin 0,2M, Glycin 0,2M, Tris 0,1M) in insgesamt 5 verschiedenen Seren untersucht. Eine typische Kurve ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Das Optimum lag in allen Fällen bei pH 8,5. Die Bestimmung der Enzymabhängigkeit wurde wegen der geringen Serumaktivität mit ange-

reicherten Seren durchgeführt. Die Harnstoffbildung läuft der zugegebenen Enzymmenge bis zum 40fachen der durchschnittlichen normalen Serumkonzentration proportional (Abb. 5).

Normwerte, klinische Auswertung

Aus Untersuchungen an 50 Seren von Gesunden errechneten wir für die Arginaseaktivitäten im menschlichen Serum einen Normalwert von $6,5 \pm 3,2$ U/l. Bei

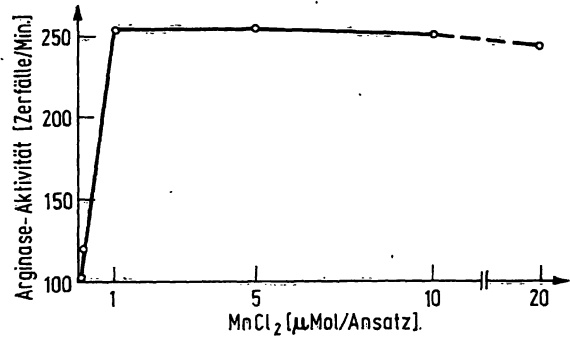


Abb. 1
Abhängigkeit der Arginase-Aktivität im Serum von der Mn^{++} -Konzentration. Serum einer gesunden Versuchsperson

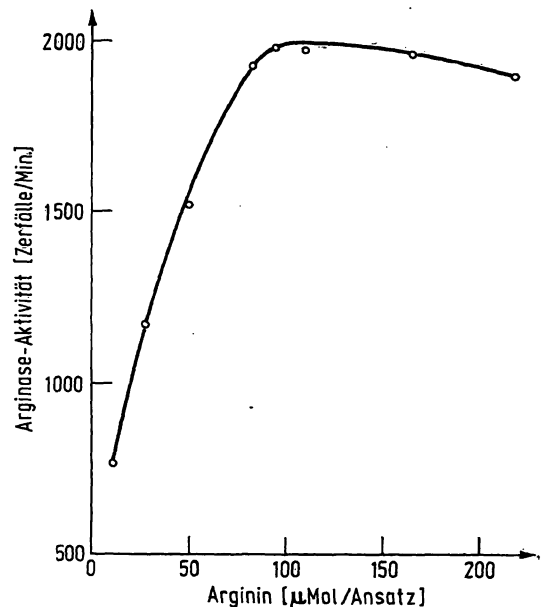


Abb. 2
Substratabhängigkeit. Ordinate = Harnstoff- ^{14}C -Aktivität (Δdpm), Abszisse steigende Argininkonzentrationen

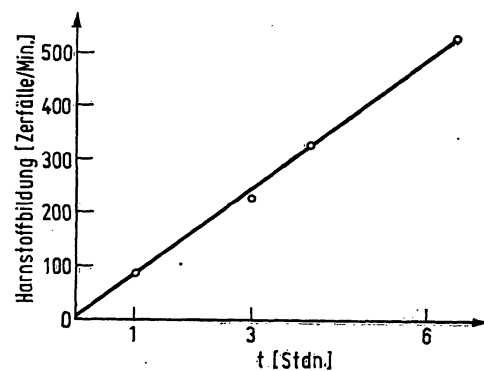


Abb. 3
Zeitabhängigkeit der Harnstoffbildung aus Arginin. Ordinate = Harnstoff- ^{14}C -Aktivität (Δdpm). Versuchsansatz siehe Text

Auch die kleinste Bestellung wird von uns wie ein großer Auftrag behandelt.

Eine Ratte – drei Tage schwanger.
Eine männliche Maus – 18-20 gr. schwer.
Oder irgendeine Maus oder Ratte nach Ihren
speziellen Wünschen.

Wir sind für jede Bestellung dankbar,
egal ob sie groß oder klein ist. Dafür liefern
wir Ihnen die besten Versuchstiere, die Sie
kaufen können. Diese Tiere werden unter
denselben gewissenhaften Bedingungen
gezüchtet, die von den Charles River Labo-
ratorien in ganz Nord-Amerika gestellt
werden.

Da dies die besten und gesündesten
Tiere sind, die zur Verfügung stehen, benö-
tigen sie keine besonderen Behausungen,
um einheitlichere Forschungsergebnisse zu
erzielen. Das bedeutet, dass die Auswertung
der wissenschaftlichen Fakten äußerst
präzise ist. Was wollen Sie mehr?

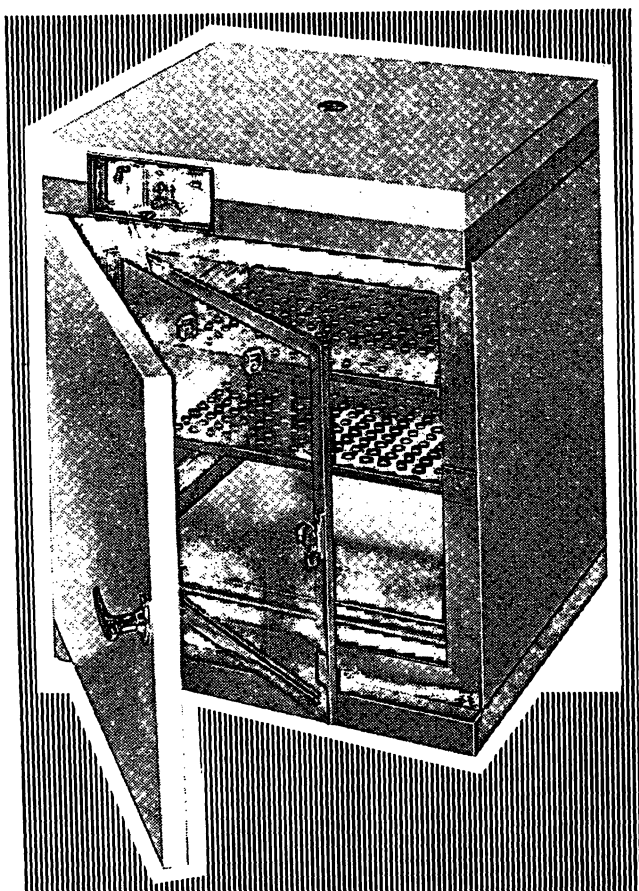
Die Arche Noah nahm immer nur
zwei Tiere auf. Wir verschicken unsere
Versuchstiere auch einzeln – oder soviele
wie Sie wollen. Ein Anruf genügt:
(35) 77 18.87.

Charles River  FROM THE
HAND OF THE
VETERINARIAN
TO RESEARCH
St. Aubin-les-Elbeuf / France S.A.



**eine Tür ging auf
zu einem
modernen Programm!**

**Heißluft-Sterilisatoren
Inkubatoren mit Wassermantel
wasserfreie Inkubatoren
thermostatisierte Wasserbäder**



STATUS
korrosionsfreie Laborgeräte

Unsere Druckschrift STA-71
informiert Sie ausführlich.



WISSENSCHAFTLICHE APPARATE

HORMUTH-VETTER

6908 Wiesloch/Bd., Postfach 1348, Tel. 06222/21 47
6900 Heidelberg 1, Postfach 750, Tel. 06221 20045

Gastrokamera- Untersuchung

Grundlagen

Untersuchungstechnik, Bildbeurteilung, Ergebnisse
mit den Referaten des Ersten Gastrokamera-Seminars,
13.—15. Juni 1969, Berlin

**Herausgegeben
von Dozent Dr. H. Oshima**

Gastprofessor an der Freien Universität Berlin, Nippon-Ika-
Universität Tokyo,
Präsident der European Association for Gastrokamera Diagnosis,
unter Mitarbeit von Dr. W. BERGEMANN, Berlin

Oktav. VIII, 146 Seiten. Mit 33 Abbildungen. 1971.
Kartonierte DM 20,—

Die Gastrokamera-Untersuchung, ein schnelles, einfaches und
beschwerdearmes Verfahren zur intragastralen farbigen Fotografie
für die Magen-Diagnostik hat in Europa in den letzten Jahren
eine zunehmende Bedeutung erlangt.

Vom 13.—15. 6. 1969 wurde das *Erste Gastrokamera-Seminar* im
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin veranstaltet.

Die verschiedenen Gastrokamera-Modelle, die Untersuchungs-
technik und besonders die Beurteilungsmethode sowie -kriterien
wurden als Schwerpunkte behandelt.

Durch die Berichte der verschiedenen Untersucher aus 6 europä-
ischen Ländern wurde der derzeitige Stand der Gastrokamera-
Diagnostik in Europa dargelegt.

Die etwa 300 Teilnehmer aus 9 europäischen Ländern bewiesen
das rege Interesse an dieser Untersuchungsart.

An einer weiter zunehmenden Bedeutung dieses diagnostischen
Verfahrens ist bei der Häufigkeit von Magenkrankungen, ins-
besondere des Magenkrebses nicht zu zweifeln. Dazu soll die
Herausgabe dieser Verhandlungsberichte als Leitfaden der Gastro-
kamera-Untersuchung beitragen.



**Walter de Gruyter
Berlin · New York**

KONRAD DORFNER
Ionenaustauscher

3. Auflage

Mit 100 Abbildungen, 27 Tabellen im Text und 1 Tabellenanhang
(mit 19 Tabellen). Oktav. XII, 320 Seiten. 1970. Plastikeinband
DM 58,—

Nach der erweiterten Einführung wird eine ausführlichere Darstellung der verschiedenen Ionenaustauschertypen sowie ihrer Eigenschaften und Prüfmethode gegeben. Besonders über die Verwendung der Ionenaustauscher in der Technik wird im einzelnen berichtet, um den Neuentwicklungen gerecht zu werden. So sind die rechnerische Behandlung und die speziellen Verfahren des Festbettverfahrens, die neuesten Entwicklungen der kontinuierlichen Verfahren, die Wasseraufbereitung mit Ionenaustauschern und die Verwendung der Ionenaustauscher zur Abwasserreinigung, Metallgewinnung, Zuckerherstellung und sonstiger technischer Anwendungen in dem vorgegebenen Rahmen so umfassend wie möglich dargestellt worden. Die übrigen Kapitel wurden nach den neuesten Ergebnissen durchgearbeitet, verbessert und ergänzt.

JOHANNES FLÜGGE
**Grundlagen
der Polarimetrie**
Gerätekunde und Meßtechnik

Oktav. Mit 72 Abbildungen und 28 Tabellen. XII, 159 Seiten.
1970. Plastikeinband DM 48,—

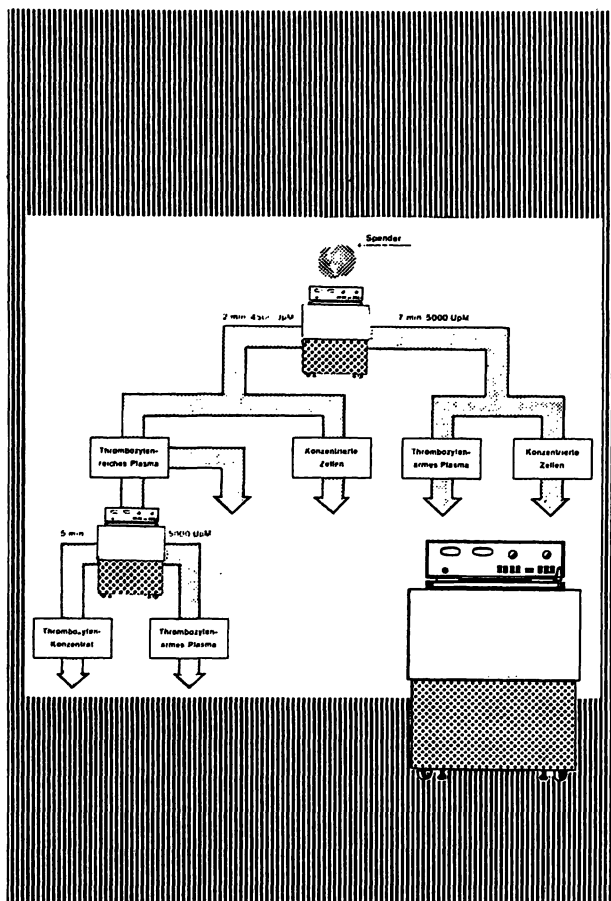
Wurde die Polarimetrie bereits seit langem als analytisches Verfahren, z. B. in Zuckerfabriken und in Betrieben der pharmazeutischen Chemie, angewandt, so hat sie sich in neuerer Zeit auch in der Erforschung von Molekülstrukturen als aufschlußreich erwiesen, besonders seitdem es automatische und Spektralphotometer bis ins Ultraviolett gibt. Das vorliegende Werk informiert über Grundlagen, Meßtechnik und moderne Geräte dieser optischen Methode und berücksichtigt ihren Stand bis in die jüngste Zeit, wobei neben der Analytik auch die Bestimmung der Rotationsdispersion, der magneto-optischen Drehung des Lichts und der Elliptizität, wie sie bei Zirkulardichroismus auftritt, besprochen werden. Photoelektrische Polarimeter und Saccharimeter werden ausführlich behandelt.



Walter de Gruyter
Berlin · New York

Mit sechzehn Rotoren kann eine automatische* RC-3 Kühlzentrifuge ausgestattet werden.

* automatisch, wie z. B. die
Blutauflbereitung in 2 Minuten



Kennen Sie das übrige Zentrifugen-Programm?

Unsere interessante
Druckschrift RC 3-702
informiert Sie ausführlich.

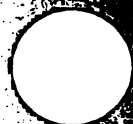


WISSENSCHAFTLICHE APPARATE

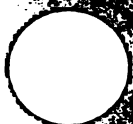
HORMUTH-VETTER

6908 Wiesloch/Bd., Postf. 1348, Tel. 06222/2147
6900 Heidelberg 1, Postf. 750, Tel. 06221/20045

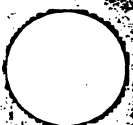
Schreiber Information



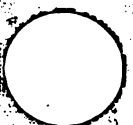
Extrem kurze
Einstellzeit



3 Aufzeichnungs-
arten:
Kugelschreiber,
Tinte, Metallstift



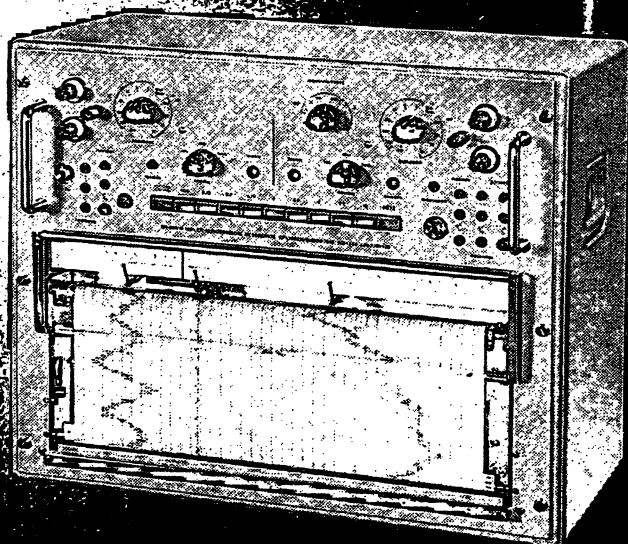
Schreibbreiten
zwischen 120 und
400 mm



Ein- und Mehrkanal-
Ausführungen in
DIN- u. 19"-Gehäusen

DAS HÜFLER SYSTEM

bedeutet für Sie:
Universelle Gestaltung durch Bau-
kastenprinzip. Dadurch ergibt sich
die Möglichkeit Ihre speziellen
Schreibprobleme zu lösen.



DR.-ING. HÜFLER

7505 ETTLINGEN · BUHLSTR. 3 · W.-GERMANY
TEL. (0 72 43) 31 26/27 · TELEX 07 826 868

Autoradiography

by

Dipl.-Chem. Helmut A. Fischer

Max-Planck-Institute for Brain Research,
Neurochemical Research Group,
Frankfurt/Main

and

Prof. Dr. Gottfried Werner

Max-Planck-Institute for Brain Research,
Neurochemical Research Group,
Frankfurt/Main

Octavo. X, 198 pages. With 93 figures
and 14 tables. 1971. Bound DM 64,—; \$ 18.80
(Working Methods in Modern Science.
Edited by Prof. Dr. Kurt Fischbeck)

"Autoradiography" describes the methods and techniques, possibilities and limitations, of the qualitative and quantitative autoradiography of macroscopic, microscopic and electron-microscopic specimens. The book is of interest to all those working with radioisotopes in scientific and medical fields and to all scientific and technical libraries, institutes, clinics and all laboratories of scientific subjects.

Weiterhin lieferbar:

Fischer—Werner, Autoradiographie. Mit 93 Ab-
bildungen und 14 Tabellen. X, 214 Seiten. 1971.
Gebunden DM 42,—

(Arbeitsmethoden der modernen Naturwissen-
schaften. Herausgegeben von Prof. Dr. Kurt
Fischbeck).



Walter de Gruyter · Berlin · New York

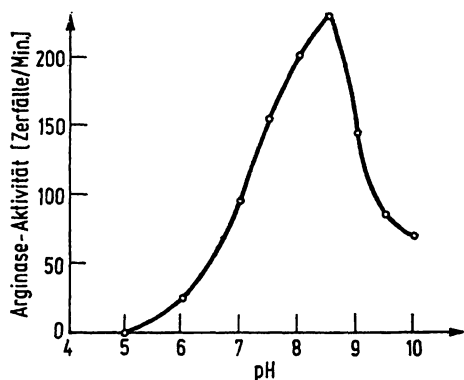


Abb. 4

pH-Abhängigkeit. Bestimmungsansatz siehe Text

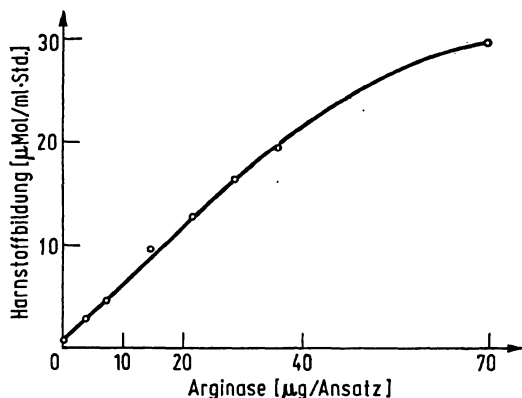


Abb. 5

Abhängigkeit der Harnstoffbildung aus Arginin von der Enzymkonzentration. Im Ansatz (siehe Text) steigende Konzentrationen von Arginase aus Rinderleber

19 Fällen von Lebercirrhose fanden wir 10mal eine Erhöhung über den 2s-Bereich. Dabei ergab sich keine Korrelation mit der Höhe der Transaminasen oder der alkalischen Phosphatase. Bei 5 Fällen von fortgeschrittener dekompenzierter Lebercirrhose waren die Transaminasen normal, die Arginase erhöht, bei den übrigen Fällen mit erhöhter Arginase die Transaminasen mäßiggradig erhöht, die Aspartat-Aminotransferase immer deutlicher als die Alanin-Aminotransferase.

Bei 22 Fällen von akuter Hepatitis wurde 17mal eine erhöhte Arginase gefunden. Auch hier war statistisch keine Korrelation mit der Höhe der Transaminasen zu sichern. Bei Transaminasewerten oberhalb 200 U/l ($n = 11$) fand sich nur 2mal eine nicht erhöhte Arginase. Bei Transaminasewerten zwischen 50–200 U/l ($n = 7$) war die Arginase 5mal normal.

Diskussion

Eine direkte Bestimmung von Harnstoff-[^{14}C] setzt die völlige Eliminierung von Arginin-[^{14}C] voraus. Zur Erzielung ausreichend niedriger Leerwerte ist daher

eine zweimalige Fällung mit Phosphorwolframsäure erforderlich. Da Harnstoff die Enzymreaktion nicht hemmt (22), ist die Harnstoffbildung aus Arginin unabhängig von der Höhe des endogenen Harnstoffspiegels.

Die von uns ermittelte optimale Substratkonzentration (0,1M Arginin) liegt etwas höher als die der meisten Untersucher (13, 18, 22, 33, 34). Allerdings werden verschiedentlich noch höhere Konzentrationen angegeben (19, 31). Die meisten Untersucher inkubieren bei pH 9,5 (9,0–9,9), dem Optimum der Arginase aus tierischer Leber (10, 14, 18, 22, 25, 26, 30, 33, 34). Das pH-Optimum von Arginase im Humanserum liegt mit allen geeigneten Puffern bei pH 8,5.

Im Serum läßt sich ohne Mangan keine Aktivität nachweisen, dagegen bei Zusatz des Aktivators in jedem Fall ($n = 136$). Die Reaktion folgt über einen großen Bereich einer Funktion nullter Ordnung und ist daher auch für die Bestimmung von hohen Arginaseaktivitäten (z. B. in Leberhomogenaten) geeignet.

Die von uns im Serum ermittelten Werte liegen etwas höher als die der meisten Voruntersucher (13, 18, 20, 25, 30, 33, 34), aber in der gleichen Größenordnung wie die von DARGEL (26) und von JERGOVIC und Mitarbeitern (22). Einige Untersucher finden keine Arginaseaktivität im Serum von Normalpersonen (14, 15, 25, 35), andere müssen zum Nachweis 6–24 Stunden inkubieren (13, 36). Alle genannten Autoren untersuchen bei pH 9,5 oder höheren Werten, zum Teil ist die Streuung erheblich (4, 17).

Unsere bisherigen Beobachtungen lassen in Übereinstimmung mit verschiedenen Voruntersuchern (25, 34, 37–42) den Schluß zu, daß eine Erhöhung von Arginase im Serum Leberkranker vorwiegend bei dystrophischen Prozessen auftritt. Wir fanden allerdings eindeutig erhöhte Werte auch bei fortgeschrittenen dekompenzierten Lebercirrhosen mit nur gering erhöhten Transaminasen. Im Vergleich zu den Transaminasen ist die Arginase bei allen anderen Lebererkrankungen jedoch offensichtlich weniger empfindlich. Ob das Enzym spezifisch für einen Leberschaden ist (18, 25, 34, 39), kann von uns nicht entschieden werden. CORNELIUS und Mitarbeiter (37) sowie PELIKAN und Mitarbeiter (39) sind der Meinung, daß der Wert der Arginasebestimmung bei Leberkranken in der Verlaufs- und Prognosebeurteilung liegt und aus einem Anstieg auf das Vorliegen von nekrotisierenden Prozessen geschlossen werden kann. Auch diese Feststellung erscheint uns aufgrund unserer Untersuchungen problematisch.

Literatur

1. GILBOE, D. D. und J. N. WILLIAMS, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N. Y.)* 91, 535 (1956). — 2. GILBOE, D. D. und J. N. WILLIAMS, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N. Y.)* 91, 537 (1956). — 3. IYER, S. N. und C. R. KRISHNA-MURTI, *Experientia (Basel)* 8, 308 (1952). — 4. LOEB, W. F. und R. A. STUHLMAN, *Clin. Chem. (N. Y.)* 15, 162 (1969). — 5. MANSUROVA, J. D. und L. G. KALETKINA, *Lab. Djelo* 4, 219 (1969). — 6. WARD, R. L. und P. A.

SRERE, *Analytic. Biochem.* 18, 102 (1967). — 7. HIRSCH-KOLB, H. und D. M. GREENBERG, *Analytic. Biochem.* 35, 60 (1970). — 8. ROMAN, W., J. RUYS und R. C. S. OON, *Enzymol. biol. clin.* 10, 354 (1969). — 9. ROSSI, N. und E. GRAZI, *European J. Biochem.* 7, 348 (1969). — 10. BLECH, W. *Z. exper. Med.* 144, 134 (1967). — 11. EDLBACHER, S. und H. RÖTHLER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 148, 264 (1925). — 12. GREENBERG, D. N., in:

- S. P. Colowick und N. O. Kaplan. *Methods in Enzymology*, II, 368. Academic Press, New York (1955). — 13. VINCENT, D. und G. SEGONZAC, *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.* 5, 390 (1960). — 14. CORNELIUS, CH. E. und R. A. FREEDLAND, *Cornell Vet.*, (Ithaca) 52, 344 (1962). — 15. FORSELL, C. M. und J. P. PALVA, *Scand. J. clin. laborat. invest.* 13, 131 (1961). — 16. KUMATE, J., v. BENAVIDES, J. CARILLO, M. SANTOS und L. RANGEL, *J. Infect. Dis.*, (Chicago) 103, 25 (1958). — 17. MANNING, R. T. und S. GRISOLIA, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, N. Y. 95, 225 (1957). — 18. MELLERUP, B., *Clin. Chem.*, (New York) 13, 900 (1967). — 19. SATOH, P. S. und YOKEI ITO, *Analytic. Biochem.* 23, 219 (1968). — 20. ZAPF, P. W., *Clin. chim. Acta*, (Amsterdam) 26, 547 (1969). — 21. HAGAN, J. J. und R. D. DALLAM, *Analytic. Biochem.* 22, 518 (1968). — 22. JERGOVIC, I., IVANA ŽUŽIC, MARIJANA FIŠER-HERMAN und B. STRAUS, *Clin. chim. Acta*, (Amsterdam) 30, 765 (1970). — 23. HUNTER, A. und J. A. DAUPHINEE, *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B* 97, 209 (1924). — 24. HUNTER, A. und C. E. DOWNS, *J. biol. Chemistry* 155, 173 (1944). — 25. UGARTE, G., M. E. PINO, P. PEIRANO und E. MARUSIĆ, *J. Laborat. Clin. Med.*, (S. Louis) 55, 522 (1960). — 26. DARGEL, R., *diese Z.* 4, 36 (1966). — 27. WEIL, L. und M. A. RUSSELL, *J. biol. Chemistry* 106, 505 (1934). — 28. HUNTER, A. und J. B. PETTIGREW, *Enzymologia* 1, 341 (1936). — 29. SLYKE VAN, D. D. und R. M. ARCHIBALD, *J. biol. Chemistry* 165, 293 (1946). — 30. CARULLI, N., *Analytic. Biochem.* 24, 515 (1968). — 31. RIGHETTI, P., L. DE LUCA und G. WOLF, *Analytic. Biochem.* 22, 225 (1968). — 32. BRAY, G. A., *Analytic. Biochem.* 1, 279 (1960). — 33. FIŠER-HERMAN, F., *pers. Mitt.* — 34. PELIKÁN, V., M. KALÁB und J. TICHÝ, *Clin. chim. Acta*, (Amsterdam) 9, 141 (1964). — 35. FRIEDMAN, M. M. und E. BECKER, *Clin. Chem.*, (New York) 1, 110 (1955). — 36. CLARK, L. C., jr. und E. I. BECK, *J. Appl. Physiol.* 2, 343 (1949). — 37. CORNELIUS, C. E., G. M. DOUGLAS, R. R. GRONWALL und R. A. FREEDLAND, *Cornell Vet.*, (Ithaca) 53, 181 (1963). — 38. McLEAN, P. und F. ROSSI, *Biochem. J.* 91, 261 (1964). — 39. PELIKÁN, V., M. KALÁB und J. NOVOSADOVÁ, *Dtsch. Zschr. Verdauungskrkh.* 23, 151 (1963). — 40. PELIKÁN, V., M. KALÁB und M. SNOFLAK, *Z. exper. Med.* 139, 278 (1965). — 41. UGARTE, G., M. E. PINO und J. VALENZUELA, *J. Laborat. Clin. Med.*, (S. Louis) 57, 359 (1961). — 42. UGARTE, G., M. E. PINO, J. VALENZUELA und F. LORCA, *Gastroenterology*, (Baltimore) 45, 182 (1963).

Priv.-Doz. Dr. J. Adlung
I. Medizinische Klinik der Med. Akademie Lübeck
24 Lübeck
Kronsforder Allee 71—73